

⑬



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 G
A 61 K

7/00
37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

i S VI. 13

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

634 334

⑳ Gesuchsnummer: 4895/78

㉔ Anmeldungsdatum: 05.05.1978

㉔ Priorität(en): 07.05.1977 DE 2720704

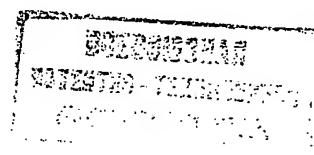
㉔ Patent erteilt: 31.01.1983

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.01.1983

㉔ Inhaber:
Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn
(DE)

㉔ Erfinder:
Dr. Hans Bohn, Marburg/Lahn (DE)
Wilhelm Winckler, Wenkbach (DE)

㉔ Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich



⑤④ Neues Glycoprotein und Verfahren zu dessen Herstellung.

⑤⑦ Das neue Glycoprotein kann im Blutserum und im Extrakt menschlicher Plazenten nachgewiesen und daraus isoliert werden. Es hat die folgenden Eigenschaften:

- einen Proteinanteil von $89 \pm 4 \%$,
- einen Kohlenhydratanteil von $11,1 \pm 2,2 \%$, davon Hexosen $5,3 \pm 1,1 \%$, N-acetyliertes Hexosamin $2,8 \pm 0,5 \%$, N-acetylierte Neuraminsäure $2,9 \pm 0,6 \%$,
- einen Sedimentationskoeffizienten S_{20x} von $3,2 \pm 0,3 S$,
- ein Molekulargewicht von $32\ 000 \pm 6\ 000$,
- einen isoelektrischen Punkt von $pH\ 4,3 \pm 0,3$,
- einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) von $13,8 \pm 1,0$,
- eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich zwischen Albumin und den α_1 -Globulinen,
- eine spezifische immunologische Reaktion mit einem spezifisch gegen das Protein gerichteten Antikörper und
- eine proteolytische Wirksamkeit.

Das Glycoprotein wird nach dem in Patentanspruch 2 angegebenen Verfahren angereichert. Es eignet sich für die Herstellung von Antiseren, die ihrerseits als Diagnostika dienen können. Ferner zeigt es proteolytische und fibrinolytische Eigenschaften und eine Blutplättchen desaggregierende Wirkung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Glycoprotein, gekennzeichnet durch
 - a) einen Proteinanteil von $89 \pm 4\%$;
 - b) einen Kohlenhydratanteil von $11,1 \pm 2,2\%$; davon Hexosen $5,3 \pm 1,1\%$, N-acetyliertes Hexosamin $2,8 \pm 0,5\%$, N-acetylierte Neuraminsäure $2,9 \pm 0,6\%$;
 - c) einen Sedimentationskoeffizienten S_{20w} von $3,2 \pm 0,3$ S;
 - d) ein Molekulargewicht von $32\ 000 \pm 6\ 000$;
 - e) einen isoelektrischen Punkt von pH $4,3 \pm 0,3$;
 - f) einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) von $13,8 \pm 1,0$;
 - g) eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich zwischen Albumin und den α_1 -Globulinen;
 - h) eine spezifische immunologische Reaktion mit einem spezifisch gegen das Glycoprotein gerichteten Antikörper;
 - i) eine proteolytische Wirksamkeit.
2. Verfahren zur Anreicherung des Glycoproteins nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Proteinlösung, in welcher das Glycoprotein immunologisch nachgewiesen werden kann, mindestens einer der folgenden Massnahmen unterworfen wird und die bezüglich des Glycoproteins angereicherte Fraktion gewonnen wird:
 - a) Zugabe von Neutralsalzen bis zur Ausfällung des Glycoproteins;
 - b) Molekularsiebfractionierung und Gewinnung der Fraktion mit einem Molekulargewicht von 25 000 bis 40 000;
 - c) Adsorption des Glycoproteins an einen schwach basischen Ionenaustauscher und Elution davon;
 - d) Zugabe von wasserlöslichen Derivaten einer Acridin- oder Chinolinbase im pH-Bereich von 5 bis 10 bis zu einer Endkonzentration von etwa 0,8 Gewichts pro Volumen %;
 - e) Behandlung der Glycoproteinlösung mit Hydroxylapatit;
 - f) Präparative Zonenelektrophorese und Gewinnung der Zone zwischen Albumin und α_1 -Globulinen; und
 - g) Behandlung der Glycoproteinlösung mit einem Immunadsorbens.
3. Verfahren nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Glycoproteinlösung ein Extrakt aus menschlichen Plazenten verwendet wird.
4. Verwendung des Glycoproteins nach Patentanspruch 1 zur Gewinnung von Antiseren.
5. Verwendung nach Patentanspruch 4 zur Gewinnung von Antiseren, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem Glycoprotein eine Immunisierung von Wirbeltieren durchgeführt wird.

Die Erfindung betrifft ein neues Glycoprotein, das im Blutserum und im Extrakt menschlicher Plazenten nachgewiesen und daraus isoliert werden kann, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Die durch die wässrige Extraktion menschlicher Plazenten erhältliche Proteinlösung enthält bekanntlich eine Vielzahl von Komponenten, die teilweise den Serumproteinen zuzuordnen und zum anderen Teil Gewebeproteine sind.

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, ein bisher noch nicht bekanntes Glycoprotein aus dem Extrakt menschlicher Plazenten zu isolieren, damit spezifisch gegen das neue Glycoprotein gerichtete Antiseren herzustellen, womit das Glycoprotein im Serum qualitativ nachgewiesen oder quantitativ bestimmt werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Glycoprotein, welches aus Blutserum und dem Extrakt menschlicher Plazenten erhältlich ist. Es ist gekennzeichnet durch

- einen Proteinanteil, vorzugsweise im wesentlichen bestehend aus α -Aminosäuren, von $89 \pm 4\%$;
- einen Kohlenhydratanteil von $11,1 \pm 2,2\%$, davon Hexosen $5,3 \pm 1,1\%$, N-acetyliertes Hexosamin $2,8 \pm 0,5\%$, N-acetylierte Neuraminsäure $2,9 \pm 0,6\%$;
- einen Sedimentationskoeffizienten S_{20w} von $3,2 \pm 0,3$ S;
- ein Molekulargewicht von $32\ 000 \pm 6\ 000$;
- einen isoelektrischen Punkt von pH $4,3 \pm 0,3$;
- einen Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) von $13,8 \pm 1,0$;
- eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich zwischen Albumin und den α_1 -Globulinen;
- eine spezifische immunologische Reaktion mit einem spezifisch gegen das Protein gerichteten Antikörper; und
- eine proteolytische Wirksamkeit.

Das Glycoprotein kann aufgrund seiner normalerweise sehr geringen Konzentration im menschlichen Serum als Spurenprotein bezeichnet werden.

- 20 Zur Erläuterung der kennzeichnenden Merkmale des Glycoproteins sei folgendes ausgeführt:

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge der Firma Beckman (Spinco-Apparatur, Modell E) bei 6 000 UpM in Doppel-
25 sektorzellen mit Hilfe der UV-Scanner Technik bei 280 nm durchgeführt. Als Lösungsmittel diente ein 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8) der 0,2 Mol/l NaCl enthält. Die Proteinkonzentration betrug 0,1 %. Die Sedimentationskoeffizienten sind auf die Basis von Wasser bei 20°C umgerechnet
30 worden.

Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde die Sedimentationsgleichgewichtsmethode und die Polyacrylamidgel-Elektrophorese herangezogen. Die Bestimmung in der Ultrazentrifuge wurde bei 9 000 UpM vorgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Zugrundelegung eines partiellen spezifischen Volumens (partial specific volume) von 0,74 ml/g. In der Ultrazentrifuge ergab sich ein Molekulargewicht von $28\ 100 \pm 2\ 000$.

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden zwei
40 Verfahren angewandt. Die Auftrennung im normalen Polyacrylamid (PAA)-Gel erfolgte nach der Methode von Zwisler und Biel, Z. klin. Chem. 4 (1966) Seite 58. Zur Untersuchung im natriumdodecylsulfathaltigen Gel wurde ein Gel mit 7,5 % PAA, das 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, verwendet. Zur Reduktion sind die Proteine in 1 % SDS mit 1 % Mercaptoäthanol inkubiert worden. Das Anfärben der Proteine geschah mit Amidoschwarz. Aus der Wanderung im SDS-haltigen PAA-Gel wurde für das Glycoprotein ein Molekulargewicht von $35\ 000 \pm 3\ 000$ abgeleitet.
50

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde mit einer Säule (440 ml) der Firma LKB Stockholm, durchgeführt. Das sogenannte Ampholin-Gemisch hatte bei der Untersuchung des Glycoproteins einen pH-Bereich von 3 bis 5.

55 Die Untersuchung der elektrophoretischen Beweglichkeit erfolgte in der Mikromodifikation von Beckman Instruments auf Celluloseacetatfolien mit Natriumdiäthylbarbiturat-Puffer pH 8,6.

Die Bestimmung der Kohlenhydrate erfolgte nach der
60 von H. E. Schultze, R. Schmidtberger, H. Haupt, Biochem. Z. 329 (1958) Seite 490 beschriebenen Methode.

Die Aminosäureanalyse wurde nach S. Moore, D. H. Spackmann, W. H. Stein, Anal. Chem. 30 (1958) Seite 1185 unter Verwendung des Flüssigkeitschromatographen Multichrom B der Firma Beckman durchgeführt. $\frac{1}{2}$ Cystin wurde nach Oxydation der Proteine mit Perameisensäure (S. Moore et al., Anal. Chem. 30 [1958] Seite 1185) und nachfolgender Chromatographie (S. Moore, J. Biol. Chem. 238

[1963] Seite 235) als Cysteinsäure bestimmt. Der Tryptophangehalt ist mit der direkten photometrischen Bestimmung nach H. Edelhoch, *Biochemistry* 6 (1967) Seite 1948 ermittelt worden.

Die immunologische Charakterisierung der Substanz erfolgt am einfachsten mit einem bekannten Diffusionsverfahren, bei welchem Antigen, d.h. Glycoprotein und ein gegen das Glycoprotein gerichteter Antikörper bzw. das hinsichtlich der Antikörper nicht angereicherte Antiserum gegeneinander in einem Trägermedium, wie z.B. Agar, diffundieren. Treffen die beiden Reaktionskomponenten in einem günstigen Verhältnis aufeinander, bildet sich ein sichtbares Präzipitat aus. Nach dieser Kenntnis ist es für den Fachmann einleuchtend, dass alle immunologischen Techniken zum Nachweis und zur Bestimmung sowohl des neuen Glycoproteins, als auch der gegen das Glycoprotein gerichteten Antikörper möglich sind.

Eine einfache und in der Regel ausreichend genaue Methode zur quantitativen Bestimmung des Glycoproteins in Körperflüssigkeiten oder in Gewebeextrakten stellt die sogenannte Laurell-Technik dar. Sie ist beschrieben in *Analyt. Biochem.* (New York), 15 (1966) Seite 45.

Die proteolytische Wirkung des Glycoproteins wurde auf Fibrinagar-Elektrophoreseplatten nachgewiesen (N. Heimburger, G. Schwick, *Protides of the Biological Fluids* 9th Coll., Brügge [1961] Seite 303).

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung bzw. zur Anreicherung des oben charakterisierten Glycoproteins, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Körperflüssigkeiten oder Extrakte von Organen, welche das Glycoprotein enthalten, unter Zugrundelegung folgender erfindungsgemäss gefundener Kriterien fraktioniert werden.

Das Glycoprotein ist mit Neutralsalzen fällbar. Mit dem üblicherweise für derartige Fällungen verwendeten Ammoniumsulfat wird das Glycoprotein bei einer Sättigungskonzentration des Salzes von 30 bis 60% in einem pH-Bereich in der Nähe des Neutralpunktes gefällt.

Entsprechend seinem Molekulargewicht kann das Glycoprotein durch Massnahmen, die zur Abtrennung von Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 25 000 und 40 000 geeignet sind, gewonnen werden. Vorteilhaft werden hierfür die Methoden der Gel-Filtration oder Ultra-Filtration eingesetzt.

Das Glycoprotein wird bei neutralem oder schwach alkalischem pH-Wert an schwach basische Ionenaustauscher adsorbiert. Vorteilhaft wird dabei eine vergleichsweise wenig konzentrierte Pufferlösung verwendet, denn durch Erhöhung der Salzkonzentration oder auch durch Erniedrigung des pH-Wertes kann die Adsorption verhindert werden. Andererseits bietet sich bei Kenntnis dieses Verhaltens die Möglichkeit an, das Glycoprotein zu adsorbieren und unter Verwendung von höherkonzentrierten Salzlösungen bzw. von Pufferlösungen mit erniedrigtem pH-Wert wieder zu eluieren.

Es hat sich gezeigt, dass das neue Glycoprotein mit den wasserlöslichen organischen Basen der Acridin- und Chinolinreihe, die für Protein-Fällungsverfahren üblicherweise Verwendung finden, nicht präzipitiert wird. Es bleibt in den bei diesem Verfahren üblichen Konzentrationen im wässrigen Überstand. Danach kann eine Acridinbase, wie 2-Äthoxy-6,9-Diaminocridinlactat oder eine Chinolinbase, wie Bis-(2-methyl-4-aminochinolyl-6)-carbamid-hydrochlorid, zur Fällung von begleitenden Proteinen verwendet werden, wobei das erfindungsgemässe Glycoprotein im Überstand verbleibt.

Ähnliche Überlegungen können gelten bei Verwendung von Hydroxylapatit als Adsorbens für Proteine. Das neue Glycoprotein zeigt keine Affinität zum Hydroxylapatit, wohingegen eine Reihe von Begleitproteinen von Hydroxylapa-

tit festgehalten wird. Dieses Verhalten des Glycoproteins ist charakteristisch, so dass der Erfinder vorschlägt, das Glycoprotein als ein Hydroxylapatit-passierendes Globulin (HPG-1) zu bezeichnen.

Aufgrund der Kenntnis der elektrophoretischen Beweglichkeit kann für die Anreicherung bzw. Isolierung des Glycoproteins die präparative Zonenelektrophorese eingesetzt werden.

Die Affinität des Glycoproteins aufgrund seines immunologischen Verhaltens kann dafür eingesetzt werden, das Glycoprotein mit Hilfe von sog. Immun-Adsorptionsverfahren anzureichern. Hierfür kann in an sich bekannter Weise ein Immunadsorbens, d.h. ein trägergebundener Antikörper, gegen das neue Glycoprotein hergestellt werden, welcher das Glycoprotein spezifisch zu binden vermag. Das Glycoprotein kann danach durch Änderung der Milieubedingungen wieder eluiert werden, wie dies in der Fachliteratur mehrfach beschrieben ist.

Durch eine ausgewählte Kombination der genannten Methoden, die einerseits zur Anreicherung des Glycoproteins andererseits zu seiner Abtrennung von übrigen Begleitproteinen führen, kann die Isolierung der erfindungsgemässen Substanz erfolgen. Demzufolge ist der Gegenstand der vorliegenden Erfindung in den einzelnen Anreicherungsschritten für das neue Glycoprotein u. in den durch Kombination der Massnahmen zur Anreicherung sich ergebenden Verfahren zu dessen Reinigung zu sehen. Die Leitlinie für das Verfahren zur Herstellung des Glycoproteins besteht darin, dass jeweils derjenige Anteil gewonnen wird, welcher eine positive immunologische Reaktion mit einem gegen das neue Glycoprotein gerichteten Antiserum ergibt.

Nach Durchführung der genannten Verfahrensschritte zeigt es sich zuweilen, dass das Glycoprotein noch von anderen immunologisch nachweisbaren Begleitproteinen verunreinigt ist. Es sind dies in der Regel Spurenproteine, wie das neue Glycoprotein selbst. In diesem Falle werden die Verunreinigungen durch deren spezifische Adsorption entfernt. Man bedient sich dabei gängiger Techniken der Immunadsorption, bei welchen nach beschriebenen Verfahren an einen Träger gebundene Antikörper gegen das zu entfernende Protein als Adsorbentien eingesetzt werden. Häufig ist das weitgehend reine neue Glycoprotein noch mit Spuren des schwangerschafts-spezifischen β_1 -Glycoproteins und/oder des α_1 -B-Glycoproteins, auch als leicht fällbares α_1 -Glycoprotein bezeichnet, vergesellschaftet. Zu deren Abtrennung können gegen die Proteine gerichtete Immunglobuline, welche kovalent an vernetzte Agarpräparationen, wie z.B. SEPHAROSE, gebunden sind, verwendet werden.

Die auf eine Säule, welche mit dem spezifischen Immunadsorbens gefüllt wurde, aufgetragene Proteinlösung läuft insoweit unbehelligt durch die Säule, als nur diejenigen Komponenten gebunden werden, gegen die der Träger einen immunologisch aktiven Partner enthält. Das neue Glycoprotein kann auf diese Weise von den Verunreinigungen befreit werden.

Zur Herstellung des neuen Glycoproteins werden mehrere der angeführten Massnahmen miteinander kombiniert und dabei jeweils diejenige Fraktion weiterverarbeitet, in der immunologisch das neue Glycoprotein nachgewiesen werden kann, während die übrigen Fraktionen verworfen werden.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des neuen Glycoproteins kann jede Körperflüssigkeit oder jeder Organextrakt verwendet werden, in welchem es gelingt, das Glycoprotein immunologisch nachzuweisen. Bevorzugt werden Extrakte menschlicher Plazenten verwendet, die z.B. durch Zerkleinerung und Extraktion mit Wasser oder einer verdünnten, zweckmässigen einer weniger als 10%igen Salzlösung,

vorteilhaft mit einer 0,5%igen Neutralsalzlösung, wie beispielsweise Natriumchlorid, gewonnen werden können. Zweckmässig verwendet man auf 1 kg Plazenten etwa 1-5 Liter der Extraktionslösung. Die nicht gelösten Anteile werden durch Zentrifugation oder Filtration von dem Extrakt abgetrennt.

Das Verfahren zur Anreicherung ist gekennzeichnet durch die Anwendung mindestens einer der folgenden Massnahmen auf Körperflüssigkeiten, welche das neue Glycoprotein enthalten und die anschliessende Gewinnung der bezüglich des Glycoproteins angereicherten Fraktion:

a) Zugabe von wasserlöslichen Derivaten einer Acridin- oder Chinolinbase, vorzugsweise des 2-Äthoxy-6,9-Diaminoacridin-lactat, im pH-Bereich von 5-10, vorzugsweise bei etwa pH 8, bis zu einer Endkonzentration von etwa 0,8% (Gewicht zu Volumen), wobei das Glycoprotein im wesentlichen im Überstand verbleibt.

b) Zugabe von Neutralsalzen bis zur Ausfällung des Glycoproteins, vorzugsweise vom Ammoniumsulfat, vorzugsweise bei etwa neutralem pH-Wert von 5-8 bis zu 30-60% der Sättigungskonzentration des Ammoniumsulfats.

c) Adsorption des Glycoproteins an einen schwachbasischen Ionenaustauscher, wie Diäthylaminoäthylcellulose, vorzugsweise bei einer Leitfähigkeit der Lösung von 0-2 mS und neutralem oder schwach-alkalischem pH-Wert (6-9), beispielsweise unter Verwendung eines etwa 0,01 M Puffers vom pH-Wert von etwa 8. Ein bevorzugt zu verwendender Puffer ist beispielsweise Tris-Hydroxymethylaminomethan-HCl. Die Elution des Glycoproteins kann in der Regel durch Senkung des pH-Wertes unter pH 7,0 oder durch Erhöhung der Leitfähigkeit über 5 mS erreicht werden.

d) Trennung aufgrund der Molekülgrösse (Molekularsiebfraktionierung). Besonders geeignet ist die Gelfiltration in einer Säule, gefüllt mit einem Polymeren entsprechender Porengrösse, beispielsweise mit Epichlorhydrin-vernetztem Dextran, als SEPHADEX® hergestellt von der Firma Pharmacia, Uppsala, mit dem Ziel der Anreicherung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000. Aber auch Produkte wie ULTROGEL® von LKB, Bromma oder BIO-GEL P® von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. können eingesetzt werden.

e) Durchführung einer Adsorption mit Hydroxylapatit. Da das Glycoprotein in verdünnter Phosphatpufferlösung von Hydroxylapatit nicht gebunden wird, ist Hydroxylapatit ein geeignetes Agens, um Begleitproteine des Glycoproteins aus der Lösung zu entfernen. Die Proteinlösung wird hierfür zweckmässig auf einen pH-Wert um den Neutralpunkt eingestellt und die Leitfähigkeit der Lösung auf etwa 1 mS gehalten.

f) Präparative Zonenelektrophorese. Geeignet für die Durchführung einer Elektrophorese ist eine das Glycoprotein enthaltende Lösung, vorzugsweise eine alkalische Pufferlösung, beispielsweise in einem Natriumdiäthylbarbituratpuffer vom pH 8,6 und einer Ionenstärke von 0,1. Die Lösung wird in eine Apparatur zur Präparativen Elektrophorese eingetragen, wie sie beispielsweise von N. Heimbürger und R. Schmidtberger in Behringwerke-Mitteilungen, Heft 43, Seite 83 ff., insbesondere auf Seite 119-120, beschrieben wird. Bei dem beispielsweise genannten Gerät handelt es sich um die horizontale Anordnung einer Trägerelektrophorese in einem offenen Trog, in welchem das Trägermaterial zur Abführung der bei der Elektrophorese auftretenden Joule'schen Wärme auf unter 10°C gekühlt wird. Als Trägermaterial dienen gegenüber Proteinen indifferente Substanzen, vorteilhaft Polyvinylchlorid, oder dessen Copolymerisate in Form eines feinen Granulats.

Es ist empfehlenswert, die Elektrophorese im alkalischen pH-Bereich, vorteilhaft bei etwa pH 8,6, bei einer Ionen-

stärke von 0,08-0,12 und bei einer Feldstärke von 4-6 Volt/cm vorzunehmen. Bei Verwendung von 0,1 M Natriumdiäthylbarbituratpuffer vom pH-Wert 8,6 wandert das Glycoprotein im elektrischen Feld in den zwischen Albumin und α_1 -Globulinen liegenden Bereich der Plasmaproteine.

Für die Gewinnung des neuen Glycoproteins wird die betreffende Zone herausgeschnitten und vom inerten Trägermaterial im allgemeinen mit Hilfe von Wasser oder wässrigen Salzlösungen, beispielsweise einer 0,5 bis 1%igen Kochsalzlösung, eluiert.

Das erfindungsgemäss hergestellte Protein hat antigene Eigenschaften. Eine damit durchgeführte Immunisierung von Tieren nach bekannten Methoden führt zur Bildung von spezifischen Antikörpern im Blut der immunisierten Tiere. Deren Seren können nach üblichen Verfahren gewonnen und die darin enthaltenen Antikörper angereichert werden. Die Antiseren können in bekannten immunologischen Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung des neuen Proteins in Körperflüssigkeiten, insbesondere in dem Blutserum, Verwendung finden. Darüber hinaus zeigt das Glycoprotein proteolytische und fibrinolytische Eigenschaften. Eine Blutplättchen desaggregierende Wirkung wurde ebenfalls nachgewiesen. Demnach hat das erfindungsgemässe Glykoprotein Eigenschaften wertvoller Arzneimittels.

Die Erfindung wird in dem nachstehenden Beispiel näher erläutert:

Beispiel

150 kg tiefgefrorene Plazenten werden zerkleinert und mit 150 l einer 0,5%igen wässrigen Natriumchloridlösung extrahiert. Der Extrakt wird mit 2n-Natriumhydroxyd auf pH 8 eingestellt und mit 50 l einer 3%igen wässrigen Lösung von Diaminoäthoxyacridinlactat versetzt. Nach einer Wartezeit von 1 Stunde wird der Überstand, der das erfindungsgemässe Glycoprotein (HPG-1) enthält, abgehebert, mit 5% festem Natriumchlorid (11 kg) zur Abscheidung des noch in Lösung verbliebenen Diaminoäthoxyacridinlactats versetzt, filtriert und mit 30% — bezogen auf das Gewicht der Flüssigkeit — festem Ammonsulfat versetzt und gut durchgerührt. Nach 1 Stunde wird der Niederschlag abfiltriert.

500 g des auf dem Filter gesammelten Niederschlages werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und gegen eine 0,01 molare Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0, die 0,05% Natriumazid enthält, dialysiert. Die dialysierte Lösung wird zentrifugiert und der Überstand wird mit der gleichen Pufferlösung auf 2 000 ml aufgefüllt, mit 0,1 n Natriumhydroxydlösung auf pH 8,0 eingestellt und mit 500 g feuchter Diäthylaminoäthylcellulose (Firma Serva, Heidelberg) 1 Stunde verrührt.

Dann wird die Diäthylaminoäthylcellulose durch Filtrieren von der Lösung abgetrennt, zweimal mit je 1 Liter 0,01 molarem Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Puffer vom pH-Wert 8,0 gewaschen und danach dreimal mit je 500 ml 0,02 molarem Tris-(oxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Puffer, pH 6,5, der 0,85% Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid enthält, eluiert.

Den vereinigten Eluaten werden 30% Ammonsulfat, bezogen auf das Flüssigkeitsgewicht, zugesetzt und das Ganze wird verrührt. Der Niederschlag, der das Glycoprotein (HPG-1) enthält, wird in 300 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Proteinlösung wird gegen Tris-Hydroxymethylaminomethan-Salzsäure-Puffer von pH 8,0, der 1,0 Mol Natriumchlorid/l enthält, dialysiert und auf eine mit Sephadex G-150 gefüllte Säule (100×20 cm) aufgetragen und mit dem genannten Puffer eluiert. Während der Elution findet eine Fraktionierung der Proteine nach deren Molekülgrösse statt.

Anschliessend werden die Eluate mit spezifischem Antiserum getestet, die das Glycoprotein (HPG-1) enthalten. Die Fraktionen werden gesammelt und daraus die Proteine nochmals, wie oben beschrieben, mit 30% festem Ammonsulfat ausgefällt.

Zur Weiterreinigung wird die Fällung in 50 ml Wasser gelöst, gegen einen 0,005 m Phosphatpuffer, pH 6,8 dialysiert und auf eine mit Hydroxylapatit gefüllte Säule, 3×23 cm, gegeben. Die Entwicklung der Säule erfolgt mit dem 0,005 m Phosphatpuffer, pH 6,8. Das Glycoprotein (HPG-1) erscheint im Durchlauf; dieser wird auf einem Ultrafilter eingengt. Das Konzentrat wird anschliessend gegen einen 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, dialysiert und an DEAE-SEPHADEX (Säule 3×23 cm) adsorbiert. Zur Elution und Auftrennung der adsorbierten Proteine dient ein NaCl-Gradient von 0-2%. Die das Glycoprotein (HPG-1) enthaltenen Eluat-Fractionen werden gesammelt, eingengt, gegen Wasser dialysiert und dann lyophilisiert. Man erhält ca. 20 mg des neuen Glycoproteins in einer Reinheit von >99%.

Es zeigt folgende Aminosäure-Zusammensetzungen (Häufigkeit mit Variationskoeffizient [VK] in %):

		Häufigkeit in Mol-%	VK %
5	Lysin	0,67	39,25
	Histidin	3,36	9,97
	Arginin	5,09	6,58
10	Asparaginsäure	5,87	3,07
	Threonin	3,83	15,74
	Serin	7,84	8,22
15	Glutaminsäure	11,76	1,35
	Prolin	6,46	1,71
	Glycin	10,24	4,49
	Alanin	11,25	3,76
20	Cystin/2	5,10	6,34
	Valin	6,87	5,18
	Methionin	0,42	14,48
25	Isoleucin	2,47	5,07
	Leucin	11,42	4,23
	Tyrosin	2,95	5,45
30	Phenylalanin	2,42	13,52
	Tryptophan	1,98	11,37